

ホヤの成分eudistomin Dの誘導体 9-methyl-7-bromoeudistomin Dによる筋小胞体Ca²⁺ 遊離チャネルに対する活性化作用

著者	梅田 麻美
号	502
発行年	2005
URL	http://hdl.handle.net/10097/15610

論文内容要旨

骨格筋および心筋の興奮-収縮連関においては、細胞膜表面の活動電位の伝播により、細胞内小器官である筋小胞体(SR)から Ca^{2+} が遊離されることにより筋収縮が引き起こされる。SR からの Ca^{2+} 遊離は、 Ca^{2+} 自身により誘発されることから、 Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release と呼ばれ、ryanodine 受容体 (RyR) を介して生じるが、その分子制御機構は十分に解明されていない。SR から Ca^{2+} を遊離させる代表的な薬物としては caffeine が知られており、 Ca^{2+} 遊離機構を研究するためのツールとして用いられてきた。RyR における caffeine 作用部位の解明は多くの研究者により試みられてきたが、caffeine の RyR に対する親和性が非常に低く、フォスフォジエステラーゼ (PDE) 阻害作用など非特異的な作用を有しているため、その詳細は明らかになっていない。一方で、これまで ryanodine をはじめ、RyR に作用する物質の作用部位に関する研究とともに、RyR 活性制御の分子機序に関する情報が蓄積されてきた。しかしながら、RyR において caffeine と同じ結合部位を占有し、同一の薬理学的特性を有する高活性化化合物は全く発見されていない。Caffeine の作用部位を解明することは、これまで caffeine を用いて研究されてきた RyR の機能を分子レベルで明らかにする上で大きな意義がある。従って、RyR に対する特異性と活性の高い caffeine 様リガンドを新規に創出することは極めて重要である。海洋天然物由来の化合物およびその誘導体の生理活性について精査した結果、カリブ海産ホヤ *Eudistoma olivaceum* から単離された eudistomin D の誘導体 7-bromoeudistomin D に強力な Ca^{2+} 遊離促進作用が見出され、その作用が caffeine と類似していたことから、eudistomin D の誘導体の中から caffeine と作用部位が同じでしかもそれよりも強力な Ca^{2+} 遊離薬を創出できる可能性が示された。そこで、本研究は RyR の分子機構を明らかにするための、強力かつ特異性の高い caffeine 様リガンドを創製することを目的として行った。

まず、eudistomin D の基本骨格である 6-hydroxy- β -carboline から 6 種類の誘導体 (7-bromoeudistomin D, 5,7-dichloroeudistomin D, 5,7-diiodoeudistomin D, 9-methyl-7-bromoeudistomin D, 9-methyl-5,7-dichloroeudistomin D および 9-methyl-5,7-diiodoeudistomin D) を合成し、骨格筋ヘビー SR フラクション (HSR) およびスキンドファイバー SR における Ca^{2+} 遊離の構造活性相関について検討を行った。その結果、6-hydroxy- β -carboline 自体には Ca^{2+} 遊離作用が認められないのに対し、これらの誘導体は caffeine と比較して、数十~数百倍強力な活性を示した。HSR において、 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ を用い Ca^{2+} 遊離作用について検討を行ったところ、 β -carboline 骨格の C-5 位と C-7 位に臭素または塩素が置換した化合物は同等の活性を有したが、ヨウ素を置換したものはこれらより 10 倍強い活性を示し、最も強力な化合物であった。C-5 位と C-7 位に臭素または塩素が置換した化合物の N-9 位へメチル基を導入すると活性はどちらの場合も 3 倍上昇したが、ヨウ素が置換した化合物では反対に活性が大幅に低下した。スキンドファイバーにおいて、6 種の誘導体の全てが自発収縮の収縮頻度を増加させ、その作用が procaine により抑制されたことから、これらの誘導体が RyR からの Ca^{2+} 遊離を介してスキンドファイバーの収縮を促進したことが推測された。 Ca^{2+} 遊離の定量的な解析を行ったところ、C-5 位と C-7 位に臭素、塩素またはヨウ素が置換した誘導体の活性は同等であった。臭素置換体の N-9 位へメチル基を導入すると 2 倍程

度活性が上昇したが、塩素またはヨウ素の置換体の場合には活性が大幅に低下した。以上のことから、HSR とスキンドファイバー SR では 6-hydroxy- β -caroline 誘導体の活性強度の関係は異なるが、どちらにおいても C-5 位と C-7 位へのハロゲン付加が Ca^{2+} 遊離活性の発現に必須なこと、およびその活性が C-5 位と C-7 位の置換ハロゲン種と N-9 位へのメチル基置換に依存し変化することが明らかとなった。以上の検討において HSR およびスキンドファイバーの両方において同等に活性を発現し、約 $2\mu\text{M}$ の EC_{50} 値を示した 9-methyl-7-bromoeudistomin D (MBED) は、SR の RyR の Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release の分子機構を詳細に研究する上で最も有用な薬理学的ツールになり得ると考えられた。そこで次に、MBED の RyR に対する作用プロファイルを明らかにするため、MBED の Ca^{2+} 遊離作用および RyR に対する各種モデレーターの作用について、caffeine と比較検討した。HSR における $^{45}\text{Ca}^{2+}$ を用いた検討では、MBED の Ca^{2+} 遊離作用の EC_{50} は約 $2\mu\text{M}$ で caffeine より 500 倍強い活性を示し、caffeine と同様に Ca^{2+} 遊離反応の Ca^{2+} 濃度-反応曲線を低 Ca^{2+} 濃度側にシフトさせた。 Ca^{2+} 電極により検討した Ca^{2+} ポンプが活性化状態の HSR においては、MBED は一過性の Ca^{2+} 遊離を引き起こし、さらにスキンドファイバーの SR においても Ca^{2+} 遊離を促進した。各評価系における MBED の Ca^{2+} 遊離作用は ruthenium red, procaine および Mg^{2+} により阻害され、非加水分解性アデニンヌクレオチドアナログの AMP-PCP の共存下でさらに促進された。これらのことから、MBED は RyR1 を介して Ca^{2+} 遊離作用を発現し、その機序は caffeine と同じであることが示された。結合実験において MBED は caffeine 同様、SR への ^3H ryanodine の結合を阻害しなかった。飽和結合実験では、MBED および caffeine は B_{max} 値に影響を与えることなく、 K_D 値を減少させることにより ^3H ryanodine の結合を促進した。これらのことから、MBED および caffeine が RyR1 において ryanodine とは別の部位に結合することにより、最大結合を変化させずに ryanodine の RyR1 への親和性を上昇させることが示された。AMP-PCP との相互作用について検討したところ、HSR において最大反応を示す濃度の MBED 存在下で AMP-PCP は $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 遊離量をさらに増大させたが、caffeine は全く増大させなかった。また、スキンドファイバーを用いた実験において MBED および caffeine の最大反応が AMP-PCP によりさらに増大した。結合実験において、MBED および caffeine の ^3H ryanodine 結合促進作用が AMP-PCP によりさらに増強された。これらのことから、MBED および caffeine の RyR1 における結合部位は同一であるが、アデニンヌクレオチドとは異なっていると考えられた。MBED はフォスフォジエステラーゼ、SR の Ca^{2+} -ATPase、myofibril ATPase および Na^+ , K^+ -ATPase の各酵素活性に影響を与えず、筋繊維に対する直接作用やイオノフォア様の作用もなかった。以上の様に、骨格筋 SR において MBED は Ca^{2+} 遊離阻害剤に対する感受性、アデニンヌクレオチドとの相互作用および SR への結合特性において、caffeine と同一であることが示された。MBED は caffeine より数百倍強い Ca^{2+} 遊離活性を示し、特異性も高かった。これらのことから、MBED は高い活性と特異性を有する caffeine 様リガンドであることが明確となった。

最後に心筋の SR に対する MBED の作用について検討した。骨格筋では dihydropyridine 受容体を介した電位変化の伝播により RyR1 から Ca^{2+} が遊離するのに対し、心筋では細胞外から流入した Ca^{2+} が RyR2 に作用して生じる Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release が収縮反応のトリガーとなる。RyR2 においても、

caffeine が Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release を促進し、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} およびアデニンヌクレオチドなど各種のモデルレーターが作用することが知られている。近年の研究により、種々の心疾患において RyR2 における caffeine 結合部位の異常が病態の発症および進展に深く関わっていることが推察されており、MBED が RyR2 においても caffeine 様リガンドであることが示されれば、疾患の分子機序の解明に有用な薬理学的ツールになると考えられる。心筋フラグメント SR を用い、MBED の Ca^{2+} 遊離作用について検討した結果、MBED は $^{45}\text{Ca}^{2+}$ の遊離を促進し、その EC_{50} 値は約 $0.3 \mu\text{M}$ であった。 Ca^{2+} 電極を用いた実験においては caffeine と同様にその Ca^{2+} 遊離作用が RyR の阻害剤である ruthenium red および Mg^{2+} により阻害された。さらに $[^3\text{H}]$ MBED を合成し SR への結合実験を行った結果、高親和性 ($K_D = 150 \text{ nM}$) の単一の結合部位が存在することが明らかとなった。これらのことから、MBED は心筋 SR において RyR2 に作用することにより Ca^{2+} 遊離を惹起し、骨格筋だけでなく心筋においても RyR の Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release 機構を分子レベルで探るための有用な薬理学的ツールであることが明らかとなった。

以上のように筆者は、強力かつ特異的な RyR 活性化薬として MBED を創製し、その薬理学的特性および結合部位が caffeine と同一であることを明らかにした。さらに、MBED は放射ラベル化が可能であり、骨格筋のみならず心筋においても Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release 機構の分子機構を解明するための強力な薬理学的ツールであることを示した。MBED の発見により、 Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release 機構を解明するための分子生物学的なアプローチが一気に可能になり、RyR の異常に基づく疾患の原因についての分子レベルでの解明や治療薬の開発に MBED が寄与できる可能性が期待される。

審査結果の要旨

本研究は、筋小胞体 (SR) の ryanodine 受容体 (RyR) を介した Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release 機構における caffeine 作用部位の役割を分子レベルで明らかにするため、特異性と活性の高い caffeine 様リガンドを新規に創出することを目的に行った。カリブ海産ホヤ *Eudistoma olivaceum* 由来物質の 7-bromoeudistomin D の骨格である 6-hydroxy- β -carboline から 6 種類の誘導体を合成し、骨格筋 SR ヘビーフラクション (HSR) およびスキンドファイバー SR における Ca^{2+} 遊離活性に関する構造活性相関について検討を行った。その結果、強力な Ca^{2+} 遊離活性を示す 9-methyl-7-bromoeudistomin D (MBED) を見出した。MBED の骨格筋 SR に対する作用プロファイルを caffeine と比較検討したところ、MBED の Ca^{2+} 遊離作用の EC_{50} 値は $2\mu\text{M}$ であり、その活性は caffeine より 500 倍強かった。この MBED の作用は caffeine と同様の Ca^{2+} 依存性を示し、RyR の阻害剤である ruthenium red, procaine および Mg^{2+} により阻害され、アデニンヌクレオチドアナログの AMP-PCP の共存下で促進された。さらに、MBED および caffeine は骨格筋 HSR に対する ryanodine の結合親和性を上昇させた。これらのことから、MBED は骨格筋 SR において RyR1 を介して Ca^{2+} 遊離作用を発現し、その作用部位は caffeine と同一であることが示された。さらに、心筋の SR に対する MBED の作用について検討した結果、MBED は Ca^{2+} 遊離作用を示し、その EC_{50} 値は $0.3\mu\text{M}$ であった。この Ca^{2+} 遊離作用は、caffeine と同様に ruthenium red および Mg^{2+} により阻害された。さらに、 $[^3\text{H}]$ MBED を合成し SR への結合実験を行った結果、高親和性 ($K_D = 150\text{ nM}$) の単一の結合部位が存在することが明らかとなった。これらのことから、MBED は心筋 SR においても caffeine と同様に RyR2 に作用することにより Ca^{2+} 遊離を惹起することが明らかとなった。以上の結果から、MBED の RyR における薬理学的特性が明確にされ、その結合部位が caffeine のそれと同一であることが明らかとなった。従って、この研究成果により、 Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release 機構における caffeine 作用部位の役割を分子レベルで明らかにすることが可能となった。

よって、本論文は博士 (薬学) の学位論文として合格と認める。